

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

---

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

Requested Patent: JP63107997A  
Title: PEPTIDE ;  
Abstracted Patent: JP63107997 ;  
Publication Date: 1988-05-12 ;  
Inventor(s): SHIBUI TATSURO; others: 05 ;  
Applicant(s): MITSUBISHI CHEM IND LTD ;  
Application Number: JP19860220835 19860918 ;  
Priority Number(s): ;  
IPC Classification: C07K13/00 ; A61K37/02 ; C12N15/00 ; C12P21/02 ;  
Equivalents:

**ABSTRACT:**

**NEW MATERIAL:** The peptide having an amino acid sequence of formula and produced by microbiological means.  
**USE:** A hypotensor.  
**PREPARATION:** For example, a piece of human heart is homogenized in the presence of guanidium thiocyanate. Whole RNA is separated from the homogenate by CsCl equilibrium density gradient ultracentrifugation and purified by oligo(dT)cellulose column chromatography to obtain mRNA. The mRNA is treated with a transcriptase in the presence of a vector primer and the obtained cDNA is digested with a restriction enzyme and cyclized with a linker to obtain a plasmid containing the cDNA fragment. E.coli is transformed by the insertion of the plasmid to obtain a cDNA library. The cDNA library is screened by using a probe consisting of a nucleotide complementary to DNA coding cardionatin. The objective peptide of formula can be produced from a clone hybridizing with the probe.

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-107997

⑮ Int.Cl.<sup>4</sup>C 07 K 13/00  
A 61 K 37/02  
C 12 N 15/00

識別記号

ABU

府内整理番号

8318-4H  
8615-4C  
8412-4B

⑯公開 昭和63年(1988)5月12日

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑭発明の名称 ベプチド

⑯特 願 昭61-220835

⑯出 願 昭61(1986)9月18日

⑯発明者 渋井 達郎 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑯発明者 内田 みちる 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑯発明者 三國 俊亮 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑯発明者 佐藤 駿美 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑯出願人 三菱化成工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑯代理人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

## 明細書

..... (I)

1 発明の名称 ベプチド

2 特許請求の範囲

(1) 下記式(I)のアミノ酸配列を有し、微生物学的に製造されたベプチド。

```

Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn
Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu
Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro
Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Glu
Val Leu Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala
Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu
Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser
Pro Ala Glu Arg Asp Gly Gly Ala Leu
Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp
Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu
Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser
Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly
Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Glu Ser
Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

```

## 3 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明は、血圧降下作用等を有するベプチドに関する。

## (従来の技術)

心房性ナトリウム利尿ペプチドについては最近、種々の報告がなされており、その一つとしてヒト心房よりヒヨコ直腸の弛緩作用を指標として分子量約13,000で、126個のアミノ酸からなるr-hANP (human atrial natriuretic polypeptide) が見出されている(例えば、代謝 vol.23, No.6, 515頁, 1985年)。

## (発明が解決しようとする問題点)

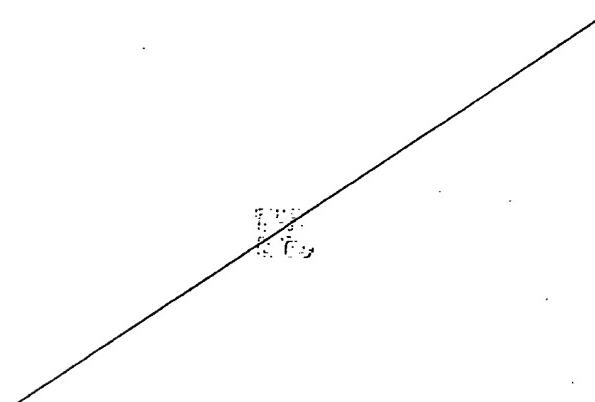
そして、遺伝子組み換えの方法によつて、このr-hANPを得ることが検討されているが、成熟型のものを得るにはいたつていない。

本発明者は先にアミノ酸残基数73よりなり、血圧降下作用を有するヒトアトリアルバソティラチン (AVD) (Atrial vasodilatine)、さ



ヌクレオチド配列及びヌクレオチド残基数を有することを要求されず DNA によってコードされる物質が  $\tau$ -hANP と同様の生理活性を有する  $\tau$ -hANP 標物質であれば、ヌクレオチド配列の一部が置換もしくは削除されあるいはヌクレオチドが付加されたヌクレオチド配列であつてもよい。

得られる cDNA フラグメントの塩基配列の部分コードの一例を下記式 (II) に示す。



次に、この DNA フラグメントを用いて、発現に好適なプラスミドを構築する一環について、さらに図面により説明する。すなわち、プラスミド pHANF #8 (Nature 310, 23, 669 '84) により得られる  $\tau$ -hANP を含む 301 bp フラグメントと、メチオニンリンカーを結合させた後、制限酵素 Hind III で消化し、333 bp フラグメントを得る。これと図 1 に示すリボソーム結合配列 (RBS) を持つリリンカーとを結合し、制限酵素 BamH I で消化し、図 2 に示す 365 bp フラグメントを得る。これをプラスミド pUC8 (P.L. Biochemicals より購入) の BamH I 部位に導入し、大腸菌を形質転換して、プラスミド pUCcds (図 3) を得る。

ついでこの pUCcds を制限酵素 Ava I で部分消化し、ターミネーション ((Term) TGATAG) リンカーを挿入し、プラスミド pUCcds Term を得る (図 4)。

また、Tac プロモーターを有するプラスミド pDR540 (P.L. Biochemicals より購入) を

```

Asp Pro Met Tyr Asn Ala Asp Val Ser Asn Ala Asp Lys Met Asp Phe Lys
AAT CCC ATG TAC ATT CCC GTG TCC AAC GCA GAC CTG ATG GAT TTC AAG

Asp Lys Lys Asp His Lys Glu Glu Lys Met Pro Lys Glu Asp Glu Val
AAT TTG CTG GAC CAT TTG GAA GAA AAG ATG CCT TTA GAA GAT GAG GTC

Val Pro Pro Glu Val Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Gly
GTG CCC CCA CAA GTG CTC AGT GAG CCG AAT GAA GAA GCG GUG GCT GCT

Lys Ser Pro Lys Pro Glu Val Pro Trp Thr Glu Glu Val Ser Pro
CTC AGC CCC CTC CCT GAG GTG CCT CCC TGG ACC GGG GAA GTC AGC CGA

Ala Glu Arg Asp Glu Gly Ala Lys Glu Arg
GCC CAG AGA GAT GAA GGT GCC CTC GCG CGG ..... (II)

```

EcoR I, BamH I で消化し、約 370 bp フラグメントを、一方、上記プラスミド pUCcds Term を Apa I, BamH I で消化し、260 bp フラグメントを得る。

一方 pHANF #8 の EcoR I, Apa I 消化後の大きい断片を得る。この三者を連結し、大腸菌を形質転換して目的とするプラスミド pHAVD (図 4) を得る。

プラスミド pHFOO6 (Nucleic Acid Research 10, 6957 (1982)) より得られる 178 bp の Pst I 断片と pSP64 (Boehringer Mannheim 社製) を Pst I で消化し、ついで SAP 处理したものを結合し pSP64-OmpF を得る。(図 7) pSP64-OmpF を Hind III で消化し、Bam 3 I で消化した後、T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し Hind III リンカーを挿入して pSP64-M33 を得る。(図 7)

得られる pSP64-OmpF M33 を Pst I で消化し T4 ポリメラーゼで平滑化させ、Hpa I リンカーを挿入し、pSP64-OmpF-Hpa I を得る。

(図8) このプラスミド pSP64-OmpF-HpaI を EcoR I、Hind III で消化し約 200 bp の断片を得る。さらに HhaI で消化し OmpF のシグナルペプチド領域を含む 85 bp の断片を得る。この断片に合成リンカー



を連結し、pUC8 を EcoR I、Hind III で消化したものに挿入してプラスミド pUC-OmpF-S + Met を得る。(図8) 得られる pUC-OmpF-S + Met を Hind III、FnuD I で消化して OmpF シグナルペプチド領域を含む 70 bp の断片と、pHANF48 により得られる AVD 遺伝子領域を含む 269 bp をさらに ApaI で消化した約 220 bp の断片を連結したものを、p<sub>b</sub>AVD を Hind III、ApaI で消化して得られる大きい方の断片に結合してプラスミド p<sub>b</sub>AVD-ΔST を得る。このプラスミドを Ava I で消化して得られる大きい方の断片とプラスミド p<sub>b</sub>AVD を Ava I で消化して得られる小さい方の断片を

#### 明細書の序言(内容に変更なし)

得られる蛋白(r-hANPペプチド)は、上記式(I)で示されるアミノ酸配列を有し、血管弛緩作用(血圧降下作用)等を有する。

#### (実施例)

以下、実施例によりさらに本発明を詳細に説明する。

なお、実施例中、制限酵素、修飾酵素等の処理は、これらの試薬の製造・販売者(宝酒造株式会社、New England Biolabs)の指示書にしたがつて行なつた。

#### 参考例1

##### <原料DNAフラグメントの調製>

(1) ヒト心臓断片を液体空素で破碎した後グアニジウムチオシアネート水溶液を添加しホモジナイズした。得られたホモジネートを、チャーチクリン(Chirgwin)らの方法(イオケミストリー(Biochemistry)18, 5294-5299, 1979)にしたがつて、塩化セシウム平衡密度勾配超速心によつて全RNAを分離した。ついで、常法によりこれをオリゴ

連結レプラスミド p<sub>b</sub>MAVD-△Pを得る。(図9)これを Hind III で消化し、BAP 处理し、プラスミド p<sub>b</sub>AVD を Hind III で消化して得られる lacZ プロモーター領域を含む 104 bp を挿入し、プラスミド p<sub>b</sub>MAVDを得る。(図9)さらにこのプラスミドを EcoR I で消化し、BAP 处理し、プラスミド pMC9 を EcoR I で、消化して得られる lacZ 遺伝子を含む 1.7 kbp の断片を挿入し p<sub>b</sub>MAVD-lacZを得る。

pHANF48 を Asp II、Ava I で消化し、BAP 处理して得られる大きい断片とプラスミド p<sub>b</sub>MAVD-lacZ を Asp II、Ava I で消化して得られる OmpA-AVD 遺伝子を含む断片を連結し、p<sub>b</sub>MANPを得る。(図11)

ついで、このプラスミド p<sub>b</sub>MANPを宿主に導入し、形質転換された宿主を常法により培養することにより、目的とする蛋白を得ることができる。

宿主としては、大腸菌、酵母菌等の微生物のほか、動物細胞を用いることもできる。

#### 明細書の序言(内容に変更なし)

(d) セルロースカラムクロマトグラフィーで精製し、ポリ(A)含有RNAを単離し、mRNA原料とした。

(2) 一方、岡山と Berg の方法(モレキュラー Molecular and アンド セルラー バイオロジー(Cellular Biology) 2, 161-170, 1982)により、pBR322 と SV40 のハイブリッドプラスミドを用いて、ベクタープライスマーとオリゴ(dG)テールリンカーを得た。

すなわち、pBR322 と SV40 (マツブユニット 0.71 - 0.86) のハイブリッドプラスミド 400 μg を、ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で制限酵素 Kpn I で 37°C、4 時間消化させた。

ついで、常法によりエタノール沈殿によつてDNAを回収し、これを dTTP を含む緩衝液に溶解し、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスクレオチダーゼを添加して、37°C で 30 分間反応させて、制限酵素 Kpn I の消化部位に約 60 個の dT テールを付加させ

明細書の添付(内容に変更なし)

た後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。ついで、このDNAをウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で、制限酵素Hpa Iにより消化した(37℃、5時間)。大きい方のDNAフラグメントを、アガロースグル電気泳動により精製し、ガラスパウダー法(ボーグルステイン(Vogelstein)ら、プロシーディング オブザナショナルアカデミー オブサイエンシズ オブザ ニューエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.)

76,615-619, 1979)によつて回収した。その後、このDNAを0℃でオリゴ(dA)セルロースカラムに付し、水で溶出させた後、エタノールで回収し、オリゴ(dt)テールを有するベクタープライマーを得た。

他方、pBR322とSV40(マツブユニット0.19~0.32)とのハイブリッドプラスミド/0.0μgをウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で、制限酵素Pat Iにより消化した(37℃、1時間半)。ついで、DNAを回

明細書の添付(内容に変更なし)  
て、20分間反応させ、プラスミド-cDNA:mRNAを合成し、これをエタノール沈殿しペレット状で回収した。このペレットをCoCl<sub>2</sub>、ジチオスレイトール、ボリ(A)、[<sup>32</sup>P] dCTP及びターミナルデオキシヌク

### 特開昭63-107997(5)

明細書の添付(内容に変更なし)  
收し、dGTPを含む緩衝液に溶解し、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを添加して、37℃で20分間反応させ、約10~15のdGテールを付加させた。回収したDNAを、ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で制限酵素Hind IIIにより消化させ(37℃、1時間)、ついでアガロースグル(1.8%)電気泳動に付し、小さいオリゴ(dG)テールリンカー-DNAを抽出、回収した。

(3) 岡山とBergの方法(モレキュラー アンド セルラーバイオロジー(Molecular and Cellular Biology) 2, 161-170, 1982)により、cDNAライブラリーを得た。

すなわち、Tris-HCl(pH 8.3)、HgCl<sub>2</sub>、KCl、ジチオスレイトール、dATP、dTTP、dGTP及び[<sup>32</sup>P] dCTPを含む水溶液に上記(1)で得られたmRNA 30μgと上記(2)で得られたベクタープライマー10μgを添加して、逆転写酵素の存在下に37

レオチジルトランスフェラーゼを含有する緩衝液に溶解し、37℃、10分間反応させ、末端あたりdCMPの10~15の残基を付加させた。

ついで、回収したオリゴ(dC)テールプラスミド-cDNA:mRNAを含有するペレットをウシ血清アルブミンを含む緩衝液に溶解し、制限酵素Hind IIIで37℃、1時間消化し、エタノール沈殿により、Hind III消化オリゴ(dC)テール-cDNA:mRNAプラスミドを回収した。

これを前記(2)で得られたオリゴ(dG)テールリンカ-DNAを含む緩衝液に溶解し、65℃、2分間インキュベートし、さらに42℃、30分間保持し、0℃に冷却した。ついで、β-NAD(ニコチンアデニンジヌクレオチド)存在下、大腸菌(E. coli)DNAリガーゼを加えて、一夜インキュベートした。その後、dATP、dTTP、dGTP、dCTP、β-NAD、E. coli DNAリガ

特開昭63-107997(6)

明細書の添付(内容に変更なし)

ついで、このオリゴⅠ、ⅡをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、40,000のトランスフォーマントより同プローブとハイブリダイズする2個のクローンを選択した。この2個のクローンより、cDNAフラグメントを抽出し、制限酵素地図を作成し、それに基づいて、マキサムーギルバード法(メソッド イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 65, 499-560, 1980)によつてフラグメントの塩基配列を決定した(pHANP48)。(Nature 310, 23, 699 '84)。

なおカルディオデイラチンのDNA配列は、その分子量7,500から推定されるアミノ酸の数が72~75であり、かつ生体内でプロセッシングされやすいアルギニンの位置から推定した。

上記ヒト由来のカルディオデイラチンは、上述のブタ由来のカルディオデイラチン(アナトミー アンド エンブリオロジー (Anatomy and Embryology) 168, 307-313, 1983)と比

ーゼ、E.coli DNAポリメラーゼ及びE.coli RNase Hを添加して、この混合物を37°C、1時間、次いで室温で1時間インキュベートした後、冷却し、反応を停止させ目的とするcDNAフラグメント含有プラスミドを得た。

ついで、このプラスミドを用いて常法により、大腸菌(E.coli)HB101を形質転換した。

(4) 一方、カルディオナトリシンのMet-Asp-Arg-Ile-GlyをコードするDNA配列に相補性のスクレオチドを2つのグループとして合成した。

J'-TAC CTA GCA TAA CC-5' (オリゴⅠ)  
G G  
C T  
T  
TCT C  
  
J'-TAC CTG GCA TAA CC-5' (オリゴⅡ)  
G G  
C T  
T  
TCT C

明細書の添付(内容に変更なし)  
較し、N端側30個のアミノ酸配列においては、箇所相違する。

#### <プラスミドpHANP48の調製>

(1) pHANP48をPvuIIとRsaIで消化し、カルディオデイラチンを含む301 bp フラグメントを得る。これをメチオニンリンカーとT4 DNAリカーゼにより結合させ(37°C、14時間)、ついで制限酵素HindIIIで消化し(37°C、2時間)、333 bp フラグメントを得る。このフラグメントと図1に示すリボソーム結合配列を有するリンカーとをT4 DNAリガーゼにより連結し(37°C、14時間)、さらに、制限酵素BamHIで消化し(37°C、2時間)、図2に示す365 bp フラグメントを得た。

一方、プラスミドpUCcd8を制限酵素BamHIで消化し(37°C、2時間)、上記365 bp フラグメントをこのBamHI部位に導入した。ついで、大腸菌JM105を形質転換し、Xgal上の白コロニーを選択し、プラスミドpUCcd8

明細書の添付(内容に変更なし)  
(図3)を得た。



上記プラスミドを制限酵素 Apa I で部分消化し(37°C、30分)、停止コドンを含む上記したリンカー(ターミネーションリンカー)をT<sub>4</sub>DNAポリメラーゼ存在下で連結させプラスミド pUCed8 termを得た(図4)。

さらに、T<sub>4</sub>プロモータを有するプラスミド pDR540を制限酵素 EcoR I、BamH I で消化し(37°C、2時間)、約390 bp フラグメントを得る(図5)。一方、上記プラスミド pUCed8 termをApa I、BamH I で消化し(37°C、2時間)、260 bp フラグメントを得た(図5)。

一方 pHANF48 を Apa I、EcoR I で消化し、アンビシリン耐性遺伝子を含有する大きいフラグメントを得た(図5)。

このようにして得た三つのフラグメントをT<sub>4</sub>DNAリガーゼで連結した後(37°C、14時間)、得られたプラスミドで大腸菌 JM105を形質転換し、形質転換株よりプラスミド phAVD(図6)を得た。

(30 bp)。(図7)

得られた pSP64-OmpF-M<sub>1</sub>J<sub>1</sub> を Pst I で消化し、T<sub>4</sub>DNAポリメラーゼで平滑化させ、Hpa I リンカーを結合し、その後 Hpa I で消化し、リガーゼで閉環しプラスミド pSP64-OmpF-H<sub>pa</sub> Iを得た。(図8)

<プラスミド pUC-OmpFS + Met の構築>

- (1) プラスミド pUC8を EcoR I、ついで Hind III で消化し Ampr の遺伝子をもつ EcoR I - Hind III 断片を得た。
- (2) プラスミド pSP64-OmpF-H<sub>pa</sub> I を EcoR I、ついで Hind III で消化し、約200 bp の断片を得た。さらに Hpa I で消化し、OmpF シグナルペプチド領域を含む約5 bp の断片を得た。

上記(1)、(2)で得られた2つの断片と合成リンカー



とをT<sub>4</sub>DNAリガーゼにより連結し、プラス

### 参考例 2

プラスミド pHP006 ( Nucleic Acid Research 10, 6957 (1982) ) を制限酵素 Pst I で消化し、78 bp の Pst I 断片を得た。一方、プラスミド pSP64 ( Boehringer Manheim 社製) を制限酵素 Pst I で消化し、ついでアルカリホスファターゼで処理した後、上記 Pst I 断片と統合させ、プラスミド pSP64-OmpFを得た。(図9)

このプラスミド pSP64-OmpF を制限酵素 Hind III で消化し、Bal J で消化した後、T<sub>4</sub>DNAポリメラーゼで末端を平滑化した。次に Hind III リンカーを連結し、さらに Hind III で消化し、その後リガーゼで閉環させた。

ついで、このプラスミドで大腸菌を形質転換させ、得られる形質転換株からプラスミド DNAを分離した。

このプラスミドを Hind III、Pst I で消化し、150 bp より小さい断片を選択しクローン版 33を選んだ。( Pst I - Hind III 消化断片は

ミド pUC-OmpF-S + Metを得た。(図8)

<プラスミド p<sub>b</sub>MAVDの構築>

プラスミド pUC-OmpF-S + Metを Hind III - FnuD II で消化し、OmpF シグナルペプチド領域を含む約70 bp の断片を得た。

一方参考例1で得られた pHANF48 を Alu I で消化し、AVD 遺伝子領域を含む269 bp の断片を得、さらに Apa I で消化し、約220 bp の断片を得た。この両断片を連結し、これをさらに、参考例で得られたプラスミド phAVDを Hind III、Apa I で消化して得られた大きい方の断片と T<sub>4</sub>DNAリガーゼにより連結し、プラスミド phAVD-△STを得た(図9)

得られたプラスミドを Apa I で消化して得られる大きい方の断片と、プラスミド phAVDを Apa I で消化して得られる小さい方の断片とを T<sub>4</sub>DNAリガーゼにより連結し、プラスミド phMAVD-△Pを得た。(図9)

これを Hind III で消化し、BAP 处理したプラスミド p<sub>b</sub>AVDを Hind III で消化して得た

104 bp の lac プロモーターを挿入し、プラスミド p<sub>h</sub>MAVDを得る。(図9)

これを EcoI で消化し、BAP 处理し、一方プラスミド pMC7 を EcoI で消化し、lacI 遺伝子を含む 1.7 kbp の断片を得、両者を結合してプラスミド p<sub>h</sub>MAVD-lacIを得た。(図10)  
実施例1

#### <プラスミド p<sub>h</sub>MANF の構築>

参考例1で得られたプラスミド p<sub>h</sub>HANF48 を制限酵素 AatII で消化し、ついで AvaI で消化し、BAP 处理して大きい断片を得た。

一方、上記プラスミド p<sub>h</sub>MAVD-lacI を AatII・AvaI で消化し、omp-AVD 遺伝子を含む断片を得た。

この両断片をリガーゼで連結し、プラスミド p<sub>h</sub>MANFを得た。(図11)

#### <ペプチドの产生>

プラスミド p<sub>h</sub>MANF で形質転換した大腸菌 Y<sub>A</sub>2/1 を L-プロス中で培養(37°C, 3時間)した後インデューサーとして 2 mM IPTG

(イソプロピルチオガラクトサイド)を加え、さらに 4 時間培養し、集菌した。これを浸透圧ショック処理し、ペリプラズム画分を抽出した。SDS-PAGE で分子量約 21,000 の移動度に相当するバンドを抽出し、HPLC に付し、そのアミノ酸配列を決定したところ、式(I)で示される配列であつた。

#### (発明の効果)

本発明に係るペプチドは、血管弛緩作用(血圧降下作用)を有する。

#### \* 図面の簡単な説明

図1、4、5、8、9、10及び11は、本発明において用いられるプラスミドの製造工程例の概略図であり、図2は、図1における 365 bp フラグメントの制限酵素切断地図を示し、図3はプラスミド pUCcd8 の切断地図を示し、図4は、プラスミド p<sub>h</sub>AVD の切断地図を示す。

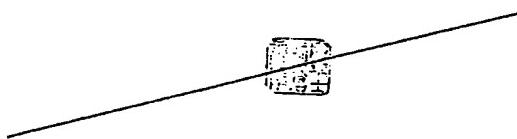


図 2

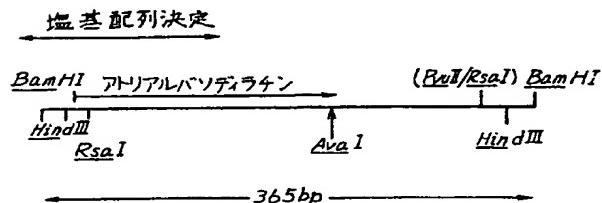


図 3

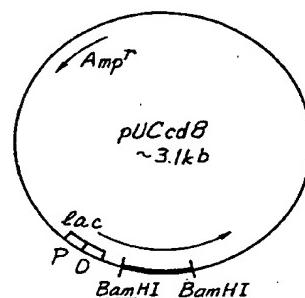
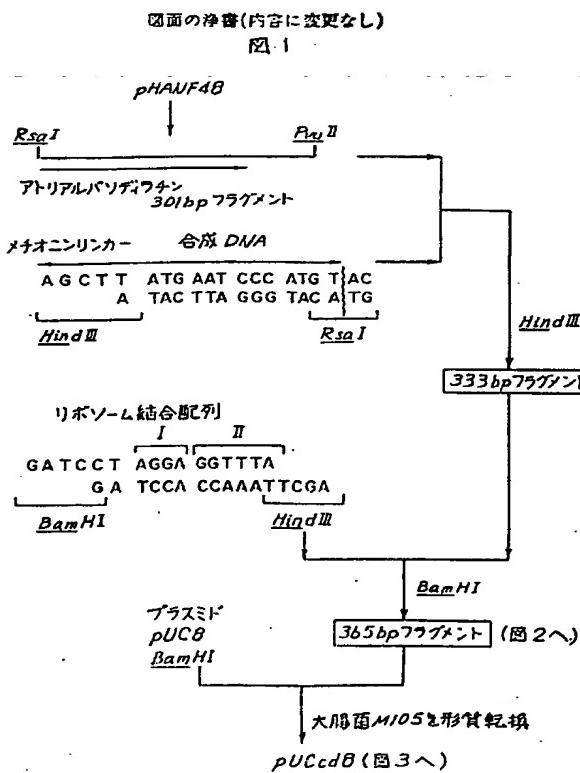


図 4

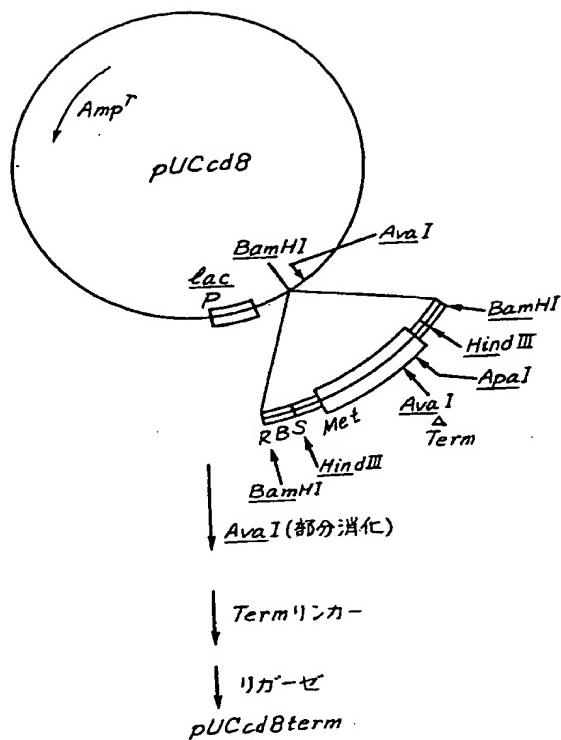


図 5

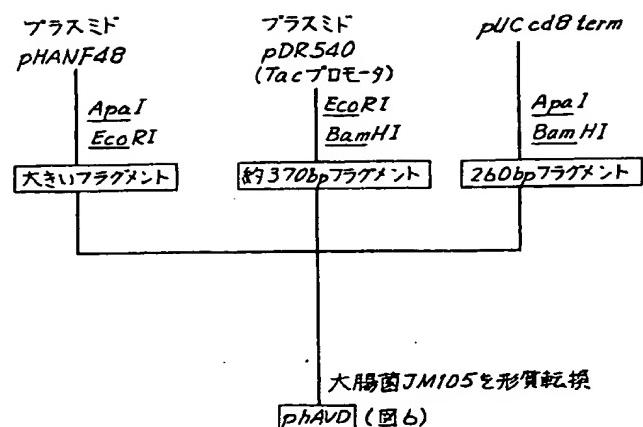
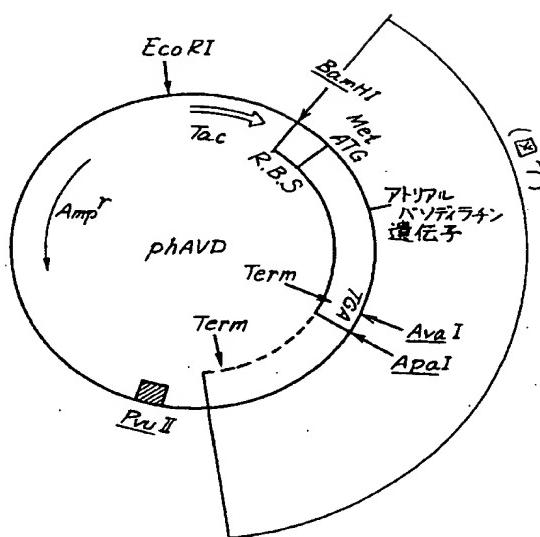
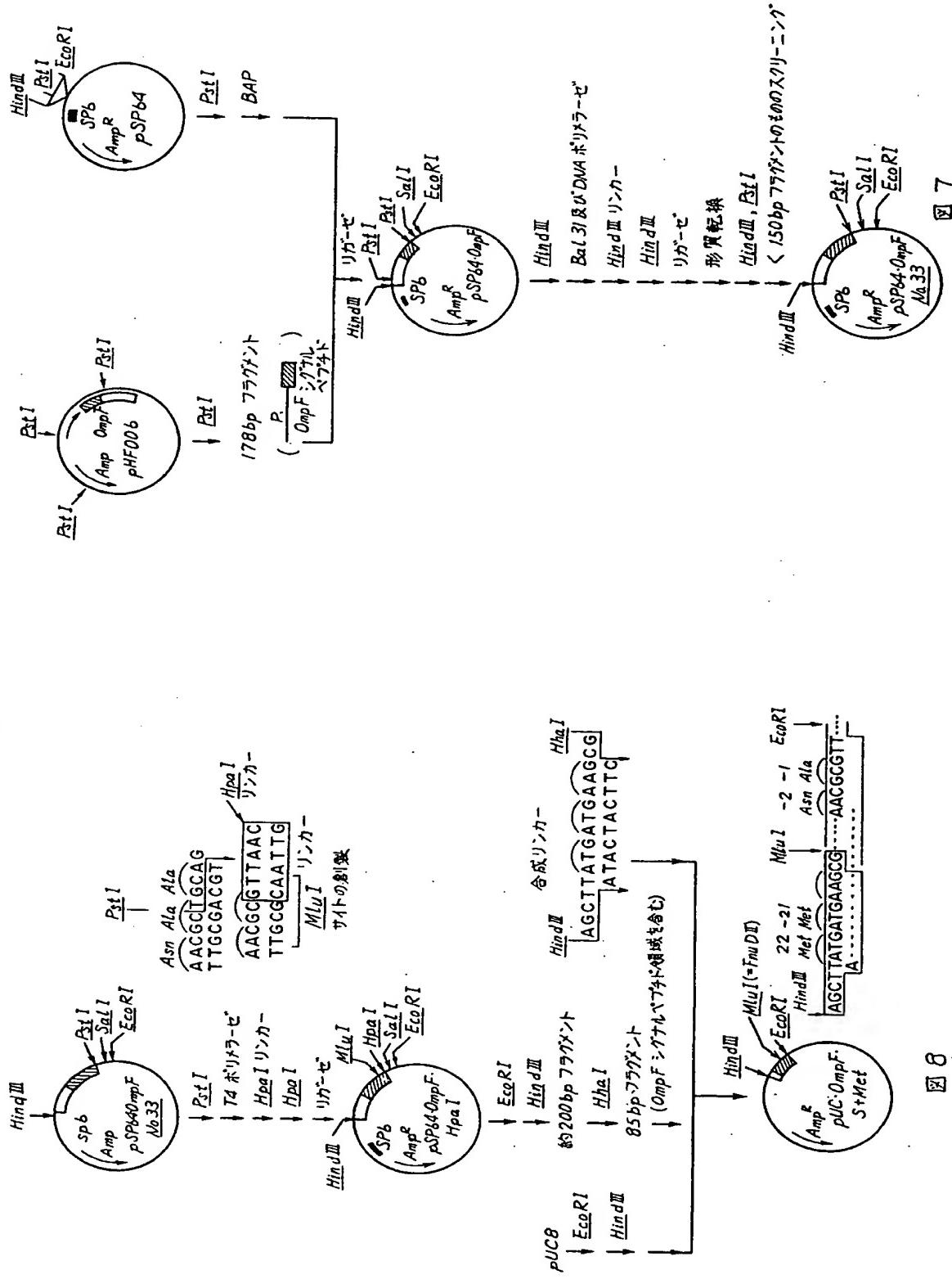


図 6





7  
四

8

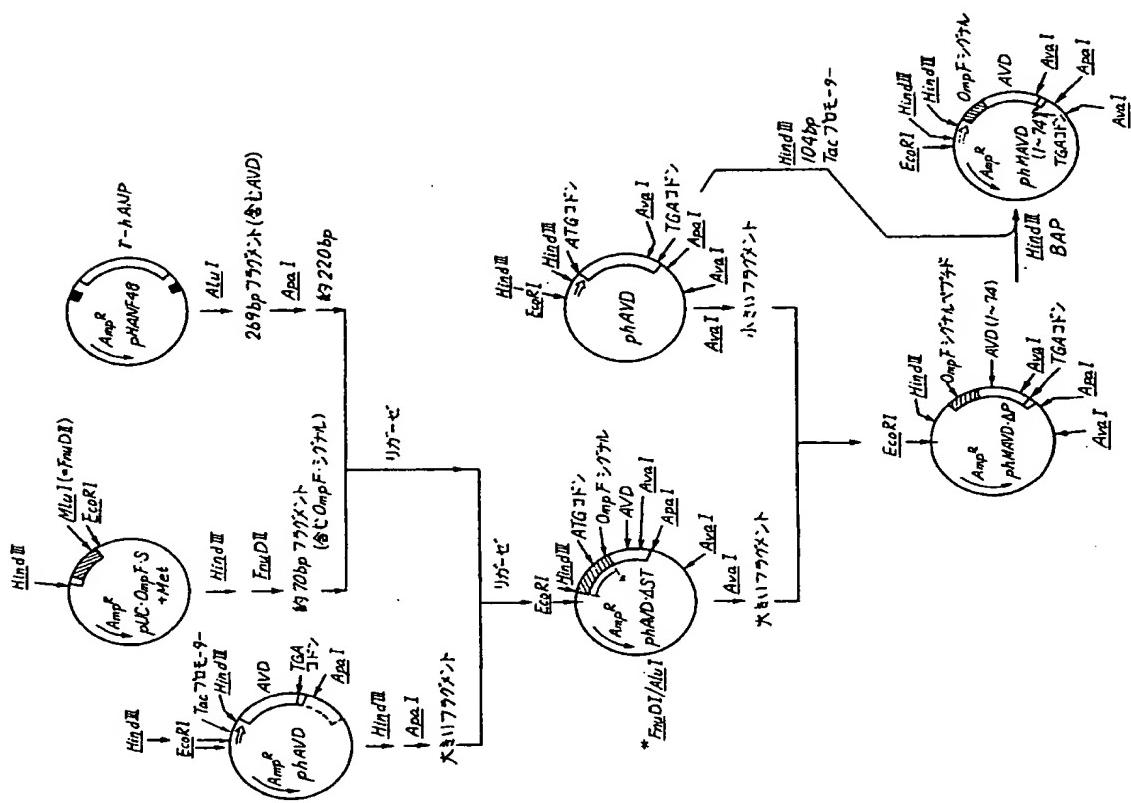


図 9

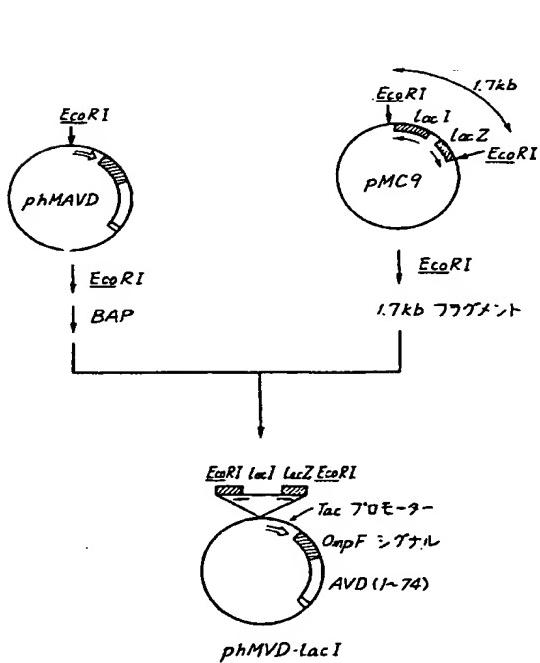


図 10

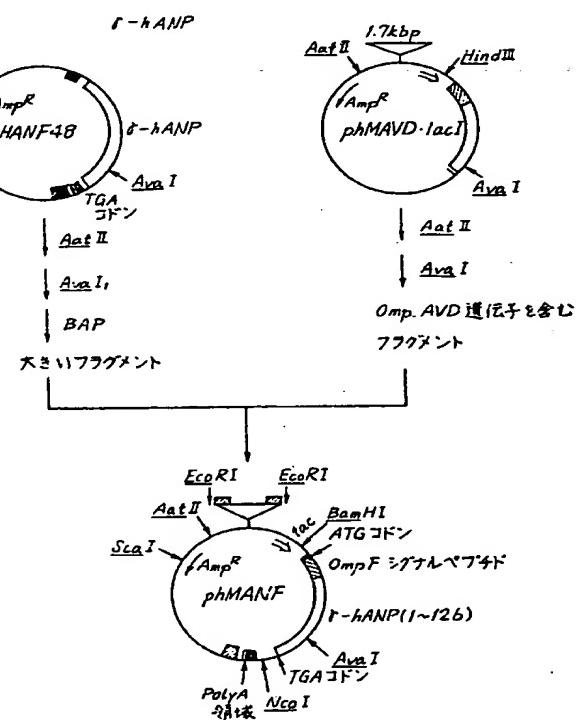


図 11

## 第1頁の続き

⑤Int.Cl.  
 C 12 P 21/02 識別記号 庁内整理番号  
 //C 12 P 21/02 6712-4B  
 C 12 R 1:19)

⑥発明者 寺 西 豊 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内  
 ⑦発明者 中 西 重 忠 京都府京都市左京区岩倉長谷町517-116

## 手続補正書(方式)

昭和61年12月12日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和61年特許願第220835号

2 発明の名称

ペプチド

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(596)三菱化成工業株式会社

4 代理人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

TEL. (283) 6976

(6806)弁理士 長谷川 一

(ほか1名)

5 補正命令の日付 昭和61年11月25日(発送日)

6 補正の対象 明細書及び図面

審査

7 補正の内容 明細書の4~7頁、13~16頁、19、

20頁と図1を別紙の通り差し替える。

(4~7頁、13~16頁、19頁、20頁)  
 (13~16頁、19頁、20頁)  
 (20頁へ)

-1208-

## 手続補正書(自発)

昭和61年12月12日

特許庁長官殿

1 事件の表示 昭和61年 特許願第220835号

2 発明の名称

ペプチド

3 補正をする者

出願人 (596) 三菱化成工業株式会社

4 代理人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

(6806)弁理士 長谷川

(ほか1名)

5 補正の対象 明細書の「発明の詳細を説明」の欄

6 補正の内容

方式

(1) 明細書第9頁第4行に「Nature」とあるを  
 「ノイチヤー(Nature)」と訂正する。

(2) 同番同頁第12行及び最下行に「81,52,13

81,52,13  
81,52,13  
81,52,13  
81,52,13

手続補正書(自発)

昭和61年12月27日

特許庁長官殿

Biochemicals」とあるを「ビー エル バイオケミカルズ (P.L Biochemicals)」と訂正する。

- (3) 同書第10頁第2行に「Nucleic Acid Research」とあるを「ヌクレイン アシッドリサーチ (Nucleic Acid Research)」と訂正する。
- (4) 同書同頁第11行に「Boehringer Manheim社」とあるを「ベーリンガー マンハイム (Boehringer Manheim)社」と訂正する。
- (5) 同書第13頁第2行に「New England Biolabs」とあるを「ニュー イングランドバイオラブズ (New England Biolabs)」と訂正する。
- (6) 同書第19頁第11行に「Nature」とあるを「ネイチャー (Nature)」と訂正する。
- (7) 同書第22頁第2行に「Nucleic Acid Research」とあるを「ヌクレイン アシッドリサーチ (Nucleic Acid Research)」と訂正する。

以上

## 1 事件の表示

昭和61年特許願第220835号

## 2 発明の名称

ペプチド

## 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(596) 三菱化成工業株式会社

## 4 代理人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

直 (283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川 一

(ほか1名)

## 5 補正の対象 図面

## 6 補正の内容 図5、6を別紙の通り差し替える。

特許庁 以上  
62.1.5  
出願第二回

図 5

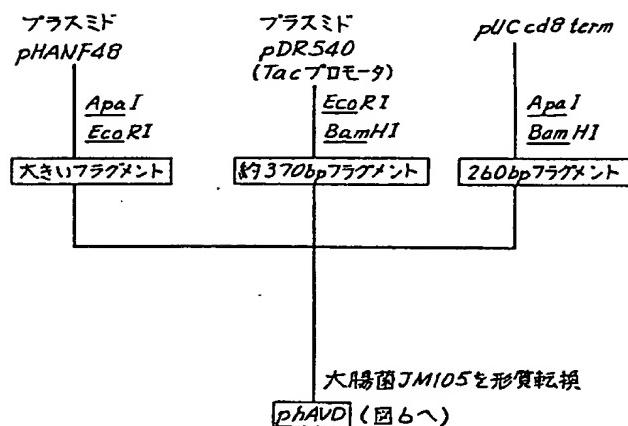


図 6

